

Aus der Chirurgischen Klinik, Campus Charité Mitte | Campus Virchow-
Klinikum der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Weiterentwicklung der Leberzelltransplantation:
In vitro Untersuchungen zur Leberzellisolierung und
Transplantation im Großtiermodell

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jeffrey Clemens Siefert
aus Freiburg im Breisgau

Datum der Promotion: 26.06.2022

Inhaltsverzeichnis

1. Abstracts	3
1.1 Abstract deutsch	3
1.2 Abstract english	5
2. Zusammenfassung	6
2.1 Einleitung	6
2.2 Material und Methoden	9
2.3 Ergebnisse	16
2.4 Diskussion	22
2.5 Literaturverzeichnis	27
3. Eidestattliche Versicherung und Anteilserklärung	32
4. Druckexemplare der ausgewählten Publikationen	36
4.1 Hepatocyte Transplantation to the Liver via the Splenic Artery in a Juvenile Large Animal Model.	37
4.2 Computed tomography-based survey of the vascular anatomy of the juvenile Göttingen minipig.	48
4.3 Human Hepatocyte Isolation: Does Portal Vein Embolization Affect the Outcome?	57
5. Lebenslauf	68
6. Publikationsliste	70
7. Danksagung	72

1. Abstracts

1.1 Abstract deutsch

Einleitung: Die Leberzelltransplantation wird als mögliche Alternative zur Lebertransplantation diskutiert, insbesondere bei pädiatrischen Patienten mit metabolischen Lebererkrankungen. Die Leberzelltransplantation ist jedoch unter anderem durch die begrenzte Verfügbarkeit von Hepatozyten und die aus der portovenösen Zellapplikation resultierenden thromboembolischen Komplikationen limitiert. Hepatozyten können aus gesundem Lebergewebe nach Leberteileresektionen aus medizinischer Indikation isoliert werden. Wesentlich für den Erfolg des Verfahrens ist die Gewinnung ausreichend vieler und metabolisch aktiver humaner Leberzellen und ein adäquates Implantationsverfahren. Ziele dieser Arbeit waren daher, die Leberzellisolierung nach medizinisch indizierter präoperativer Pfortaderembolisierung (PVE) zu untersuchen, welche zunehmend vor Leberteileresektionen durchgeführt wird. Darüber hinaus wurde im juvenilen Göttingen Minipig-Modell untersucht, ob Leberzellen mittels eines transfemorale Zugangs über die Milz in die Leber transplantiert werden können.

Methoden: Insgesamt wurden n=190 Leberzellisolierungen nach Leberteileresektion ausgewertet, wovon in n=27 Fällen präoperativ eine PVE erfolgt war. Zellausbeute, Viabilität und Hepatozytenkulturen beider Gruppen wurden verglichen. Vier Göttingen Minipigs wurden mit humanen Hepatozyten infundiert. Die Versuchstiere wurden am Tag der Infusion (n=2), zwei Tage nach Infusion (n=1) oder 14 Tage nach Infusion (n=1) finalisiert. Die Tiere wurden mittels kontrastmittelgestützter CT-Untersuchungen untersucht, darüber hinaus erfolgten serologische Untersuchungen und nach Finalisierung erfolgten Gewebeuntersuchungen.

Ergebnisse: Die präoperative PVE hatte keinen negativen Effekt auf die Zellausbeute und Viabilität nach Leberzellisolierung. Die metabolischen Parameter aus der Zellkultur beider Gruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede. Die Gefäßanatomie der juvenilen Minipigs eignete sich für die geplanten Untersuchungen. In allen Tieren gelang eine transfemorale Katheteranlage als Zugang zur A. splenica, wiederholte Zellgaben verursachten keine schwerwiegenden Nebenwirkungen. Immunhistologische Färbungen konnten transplantierte Leberzellen in der Leber nachweisen. Immunologisch konnte eine Reaktion des adaptiven Immunsystems auf die transfundierten Hepatozyten nachgewiesen werden, am Tag 18 waren keine Leberzellen mehr nachweisbar.

Zusammenfassung: Eine präoperative PVE hat keinen negativen Effekt auf die Zellausbeute und Viabilität der Leberzellisolierung. Das juvenile Göttingen Minipig ist ein geeignetes Versuchstier zur Evaluation von Katheterinterventionen im Säugling. Zellen können nach Infusion in die A. splenica durch die Milz in die Leber translozieren. Weitere Studien zum Vergleich dieser Applikationsroute mit anderen Applikationswegen sind notwendig.

1.2 Abstract english

Introduction: Hepatocyte transplantation (HcTx) is a possible alternative to liver transplantation, especially in metabolic diseases of the neonate and infant. However, hepatocyte transplantation is limited by the scarcity of hepatocytes as well as thromboembolic complications due to portal venous infusion, among other factors. Human hepatocytes can be isolated from liver tissue obtained from liver resections performed for medical reasons. For the success of the procedure both a high yield of metabolically active hepatocytes and an adequate implantation procedure are important. The aims of the study were to evaluate hepatocyte isolation after portal venous embolization (PVE), which is increasingly performed before partial hepatectomies. Furthermore, transplantation of hepatocytes to the liver via transfemoral catheterization of the spleen was evaluated in the juvenile Göttingen Minipig.

Methods: In total, n=190 hepatocyte isolations were evaluated. Of those, n=27 were subject to preoperative portal venous embolization. Yield, viability and cell cultures of hepatocytes from PVE and non-PVE livers were compared.

Four Göttingen Minipigs were infused with human hepatocytes. The animals were sacrificed directly after cell infusion (n=2), 2 days (n=1), or 14 days after infusion (n=1). All animals were examined with contrast-enhanced computed tomography. Additionally, serological examinations and tissue sampling after finalization were performed.

Results: Preoperative PVE had no negative impact on cell yield or viability after hepatocyte isolation. Metabolic parameters of hepatocyte cultures showed no significant differences. The vascular anatomy of the juvenile Göttingen Minipigs is suitable for the planned examinations. Catheter placement into the splenic artery with repetitive cell infusion was feasible without severe procedure-associated complications. Immunohistochemical staining has shown cell relocation to the liver. Immunological analyses showed a response of the adaptive immune system to the human cells. Hepatocytes were neither detected in the liver nor the spleen 18 days after HcTx.

Conclusion: Hepatocyte isolation from PVE-livers is not inferior in cell yield or viability compared to non-PVE-livers. Interventional cell application via the femoral artery is feasible in a juvenile large animal model of HcTx. The juvenile Göttingen Minipig is a suitable model for evaluation of catheter interventions in the neonate and infant. Hepatocytes translocate to the liver after infusion into the splenic artery. Further studies are necessary to compare this approach with other application routes.

2. Zusammenfassung

2.1 Einleitung

Für viele fortgeschrittene Lebererkrankungen ist die orthotope Lebertransplantation nach wie vor die Therapie der Wahl. Durch einen Mangel an Spenderorganen können jedoch Engpässe in der Patientenversorgung auftreten. Die Leberzelltransplantation (HcTx) wurde als mögliche Alternative zur Lebertransplantation diskutiert: Durch HcTx können beispielsweise Organe verwendet werden, welche nicht zur Transplantation zugelassen sind (1). Zudem können Leberzellen von einer Spenderleber für mehrere Empfänger zur Verfügung gestellt werden (2). Humane Hepatozyten sind die am häufigsten verwendeten Zellen für die therapeutische HcTx (3, 4). Die Durchführung und Weiterentwicklung der HcTx hängt daher auch von der Verfügbarkeit von humanen Hepatozyten ab.

Die verfügbare Quelle für Hepatozyten zu Forschungszwecken ist gesundes Lebergewebe, welches im Rahmen medizinisch indizierter Leberteilesektionen gewonnen wird (5, 6).

Auch ausgedehnte Leberresektionen können aufgrund der außergewöhnlichen Fähigkeit der Leber zur Regeneration durchgeführt werden (7). Um das Risiko eines zu kleinen residualen Lebervolumens zu minimieren, ist die präoperative portalvenöse Embolisation (PVE) ein etabliertes Verfahren (8). Da die PVE für die Resektion von ausgedehnten Tumoren eingesetzt wird, und humane Hepatozyten meist aus Leberteilesektaten isoliert werden, steigt der Anteil an potentiellen Spenderlebern, welche vor Isolierung portalvenös embolisiert wurden (9, 10). Es gibt eine Reihe von bekannten Einflussfaktoren auf die Ausbeute des Leberzellisolierungsverfahrens: so spielen Vorschädigung der Leber, Alter, Geschlecht, Gamma-Glutamyl-Transferase (GGT), Gewicht des Lebergewebes, kalte Ischämiezeit (CIT) und die Dauer des Kollagenaseverdaus (5, 6, 11-17) dabei eine wesentliche Rolle. Der Einfluss der PVE auf die Leberzellisolierung wurde bisher jedoch noch nicht untersucht.

Die Hepatozytentransplantation gilt als vielversprechende Therapieoption bei bestimmten angeborenen metabolischen Lebererkrankungen (4). Vielversprechende Ergebnisse wurden bei Crigler-Najjar-Syndrom Typ I (4, 18, 19), Störungen des Harnstoffzyklus (4, 18, 20) und Faktor VII-Mangel (18, 21) beschrieben. Da die beschriebenen Erkrankungen vornehmlich Erkrankungen des Neugeborenen und des Säuglings darstellen, sind Katheter-gestützte Interventionen aufgrund der geringeren Invasivität von Vorteil (22). Die

portalvenöse Applikation ist dabei der meist gewählte Zugang für die HcTx (23) – bei dieser Form der Applikation wurden allerdings in einigen Fällen Pfortaderthrombosen beobachtet (24, 25). Beim Erwachsenen wurde daher der transfemorale Zugang zur A. splenica als mögliche Alternative evaluiert (26-28). Die ektope HcTx in die Milz wird gegenwärtig primär als Alternative für Patienten mit geschädigter Leberarchitektur gesehen (29). Dies könnte auf Ergebnisse zurückzuführen sein, welche hierbei einen leberähnlichen Umbau der Milz (Hepatisierung) nahelegen (26, 30), was das Risiko von Lungenembolien durch portocavale Anastomosen reduzieren könnte (29). Jedoch wurde, hauptsächlich im Kleintiermodell, eine Translokation der in die A. Splenica infundierten Hepatozyten in die Leber beschrieben (26, 31). Bisherige Studien im adulten Großtiermodell suggerieren durch die Zellapplikation in die Milz ein geringeres thromboembolisches Risiko sowie möglicherweise eine Translokation der Zellen in die Leber (32). Somit hat diese Applikationsroute das Potential, eine sichere und breit verfügbare Alternative für die HcTx im Säugling zu werden.

Aufgrund der begrenzten klinischen Erfahrung im Säugling (33) werden weitere Studien in einem geeigneten Tierversuchsmodell für die transfemorale HcTx in die A. splenica benötigt.

Katheterinterventionen stellen im Säugling und Kleinkind unter anderem aufgrund des geringeren intravasalen Volumens und der geringen Gefäßdurchmesser eine besondere Herausforderung dar (34). Daher wird ein Tierversuchsmodell benötigt, in welchem sich diese Fragestellungen simulieren lassen. Als geeignetes Modell kommt insbesondere das juvenile Göttingen Minipig in Frage, da es mit elf Wochen ungefähr das Gewicht eines neugeborenen Menschen aufweist (35). Ein Vorteil des Göttingen Minipig gegenüber Landrasse-Schweinen ist das langsamere, lineare Wachstum (35), was zu einem widerstandsfähigeren Herz-Kreislauf-System führt (36). Weitere Vorteile sind eine stabilere Herzfrequenz (37), ein höherer Hämoglobin-Spiegel (38-41) sowie ein niedrigerer systemischer Blutdruck (37, 42).

Obwohl für das erwachsene Göttingen Minipig extensive Daten zur Anatomie des Gefäßsystems vorhanden (43) sind, fehlen diese für das juvenile Göttingen Minipig. Diese Daten sind jedoch notwendig zur Evaluation der Zugänglichkeit gewählter Zielstrukturen, wie beispielsweise der A. splenica, mittels arterieller Katheterisierung.

Im Folgenden werden die drei zur Dissertation beitragenden Veröffentlichungen zusammengefasst, welche sich mit der Isolierung von humanen Hepatozyten (44), der

Gefäßanatomie des juvenilen Göttingen Minipig (45), sowie der Transplantation von humanen Hepatozyten über die A. splenica im Juvenilen Göttingen Minipig (46) befassen. Das Ziel dieser Studien war die Weiterentwicklung der Leberzelltransplantation.

Zunächst wurde evaluiert, ob PVE-Lebern eine mit non-PVE-Lebern vergleichbar geeignete Quelle für humane Hepatozyten sind. Hierfür wurden beide Gruppen hinsichtlich der bekannten Einflussfaktoren und der Isolierungsergebnisse verglichen. Zudem wurden Hepatozyten beider Gruppen kultiviert und hinsichtlich metabolischer Parameter untersucht.

Zur Erleichterung weiterer Tierversuchsvorhaben in präklinischen Studien und der Grundlagenforschung wurden Gefäßdaten des juvenilen Göttingen Minipigs erhoben. Die Intention der Tierversuche war die Evaluation der Durchführbarkeit einer transfemorale Katheterisierung der A. splenica mit multiplen Zellinfusionen durch die Verwendung von juvenilen Göttingen Minipigs als Großtiermodell. Mittels humaner Hepatozyten, welche sich immunhistologisch nachweisen lassen, sowie peri- und postinterventioneller Bildgebung, sollten Erkenntnisse über Engraftment, Translokation, langfristiger Viabilität und thromboembolischen Komplikationen gewonnen werden.

2.2 Material und Methoden

Auswahl und Zusammensetzung der Studienkohorte

Insgesamt wurde Lebergewebe von 262 Patienten zur Hepatozytenisolierung gewonnen. Die Proben stammen von Patienten, bei welchen eine Leberteilektomie oder Lebertransplantation in der Abteilung für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie der Charité – Universitätsmedizin Berlin durchgeführt wurde. Die Probengewinnung und Leberzellisolierung erfolgte im Zeitraum von September 2005 bis Oktober 2014. Alle Experimente wurden unter Einwilligung der Patienten und mit Genehmigung der Ethikkommission der Charité – Universitätsmedizin Berlin (Antragsnummer: EA1/289/16) durchgeführt. Leberzellisolierungen, bei welchen von der Standard-Operationstechnik abgewichen wurde ($n=52$), Gewicht des Lebergewebes ($n=2$) oder andere wichtige Informationen fehlen ($n=2$), sowie Proben von Leberexplantation vor Transplantation ($n=14$), sind von der Analyse ausgeschlossen worden. Insgesamt flossen 190 Hepatozytenisolierungen in die Analyse ein. Diese wurden in zwei Gruppen aufgeteilt, je nachdem, ob eine PVE vor Operation durchgeführt wurde (PVE, $n=27$), oder nicht (non-PVE $n=163$).

Klinische- und Laborchemische Parameter

Alter, Geschlecht und Diagnose der Spender wurden routinemäßig als Bestandteil des Isolierungsprotokolls dokumentiert. Weitere standardmäßig erhobene Parameter sind das Gewicht des Lebergewebes, Dauer des Kollagenaseverdaus und kalte Ischämiezeit (CIT). Die CIT ist die Zeitspanne der gekühlten Lagerung des Lebergewebes vom Zeitpunkt der Probengewinnung bis zum Beginn des ersten Perfusionsschrittes. Präoperative Laborwerte (GGT, AST, ALT, AP, Bilirubin, aPTT und Quick) wurden aus den Patientenakten entnommen.

Hepatozytenisolierung

Leberproben wurden aus dem Rand des makroskopisch tumorfreien Lebergewebes nach Resektion gewonnen. Wurde beim Spender eine PVE durchgeführt, liegt dieser Rand im embolisierten Gebiet. Die Proben wurden unter sterilen Bedingungen entnommen, in 4°C kaltes William's E medium transferiert und umgehend in das Labor transportiert. Hepatozytenisolierung wurde unter sterilen Bedingungen nach einem standardisierten Isolierungsprotokoll durchgeführt. Die zweistufige Kollagenase-Perfusionstechnik wurde bereits in verschiedenen Veröffentlichungen beschrieben (11, 47, 48).

Die Viabilität und Zellzahl wurde vor und nach Aufreinigung mittels Typanblau-Exklusions-Test bestimmt.

Hepatozytenkultur

Aus PVE-Lebern ($n=4$) und non-PVE-Lebern ($n=3$) isolierte Hepatozyten wurden direkt nach Isolierung auf mit Kollagen beschichteten sechs-Well-Platten kultiviert. Die Zellen wurden mit einer Dichte von 1×10^6 viablen Zellen pro Well aufgebracht. Die Zellen wurden bis zu 6 Tage in William's E medium (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) kultiviert, welches mit $1 \mu\text{M}$ Insulin (Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN, USA), $1 \mu\text{M}$ Fortecortin (Merck Serono GmbH, Darmstadt, Deutschland), 1mM Natriumpyruvat, 10mM HEPES, $100 \text{U/ml}/100 \mu\text{g}$ Penicillin/Streptomycin (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) und 10% fetalem Kälberserum (FCS) (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) versetzt wurde. Das Kulturmedium wurde zunächst nach 12 Stunden und im Anschluss alle 24 Stunden gewechselt. Der Überstand des Mediums wurde gesammelt.

Messung der biochemischen Parameter aus dem Kulturmedium

Die biochemischen Parameter wurden aus dem Überstand des Kulturmediums nach 2, 4 und 6 Tagen Kultur gemessen. AST und ALT wurden mittels Fluitest® GOT AST (Analyticon Biotechnologies AG, Lichtenfels, Deutschland) und Fluitest® GPT ALT (Analyticon Biotechnologies AG, Lichtenfels, Deutschland) gemessen. Die Messungen wurden dreifach durchgeführt. Urea wurde mittels Quantichrom™ Urea Assay Kit (BioAssay Systems, Hayward, CA, USA) gemessen. Albuminsynthese wurde mit dem Human Albumin ELISA Quantitation Set (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA) gemessen. Die Messung der VEGF-Sekretion erfolgte mit dem Human VEGF Quantikine® ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). ELISA-Messungen wurden jeweils doppelt durchgeführt. Die Durchführung aller Tests erfolgte nach Herstellerangaben.

Versuchstiere

Die Versuche zur HcTx wurden an vier weiblichen Göttingen Minipigs durchgeführt. Das Gewicht der Versuchstiere war $7,3 \text{kg}$ (Schwein 1), $5,6 \text{kg}$ (Schwein 2), $6,1 \text{kg}$ (Schwein 3) und $12,6 \text{kg}$ (Schwein 4). Zudem wurde ein weiteres Versuchstier zur Etablierung des interventionellen Zugangs mit einem Gewicht von $5,5 \text{kg}$ verwendet (Schwein 0). Die Tierversuche wurden durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin genehmigt (Reg Nr. G 0260/13). Die Versuche fanden unter direkter Supervision des

Tierschutzbeauftragten statt. Die Tiere waren im ISO 9001:2008 zertifizierten tierversuchstechnischen Labor der Abteilung für experimentelle Medizin der Charité – Universitätsmedizin Berlin untergebracht.

Die Studie zur Gefäßanatomie des juvenilen Göttingen Minipig verwendet CT-Daten, welche im Rahmen des oben genannten Protokolls generiert wurden. Die genutzten Daten wurden an Schwein 0, Schwein 1, Schwein 2 und Schwein 3 erhoben.

Zwei Versuchstiere wurden direkt nach HcTx finalisiert, eines an Tag 2 nach der ersten HcTx, ein weiteres an Tag 18 nach der ersten HcTx. Das Versuchstier zur Etablierung des interventionellen Zugangs wurde am Tag der Intervention finalisiert.

Bildgebung

Farbkodierte Dopplersonographie (FKDS) wurde während jedes Infusionszyklus verwendet, um das Flussprofil der Pfortader und der A. splenica zu kontrollieren. FKDS wurde unmittelbar vor und nach jeder Infusion durchgeführt.

Die CT-Untersuchungen wurden als CT-Angiographie von der Abteilung für Radiologie des Charité Universitätsklinikums Berlin durchgeführt. Als Kontrastmittel wurde Iopromid mit einer Iodkonzentration von 370 mg/ml verwendet (Ultravist 370; Bayer, Berlin, Deutschland) verwendet. Die Messung erfolgte in 3 Phasen. Diese wurden eine Woche vor der ersten Intervention durchgeführt. Eine Ausnahme bildet hierbei das Versuchstier zur Etablierung des interventionellen Zugangs, hier wurde die CT-Untersuchung am Tag der Intervention durchgeführt. In Schwein 4 wurden zusätzliche CT-Untersuchungen an Tag 4 und Tag 18 nach der ersten Zellinfusion durchgeführt.

Bildanalyse der CT-Angiographien

Die Darstellung und Analyse der Bilder erfolgten durch das Bildverarbeitungsprogramm Visage 7.1 (Visage Imaging GmbH, Berlin, Deutschland). Das Messprotokoll für die Gefäße wurde unter Mitarbeit eines Facharztes für Radiologie entwickelt. Die Messungen wurden voneinander unabhängig durch vier in der Methode geschulte Forscher durchgeführt. Als Endpunkte der Messungen wurde die Grenze des Kontrastmittel-Signals definiert. Um die Genauigkeit der Messungen zu definieren, wurden die Schnittebene des Gefäßes orthogonal zum Gefäß ausgerichtet. Wie unter „Ergebnisse“ vermerkt, konnten manche Gefäße aus technischen Gründen nur bei drei Tieren vermessen werden.

Die Messpunkte wurden aus der Arbeit „*Computertomographisch gestützte Makro- und Mikromorphometrie von Blutgefäßen des Göttingen Minipigs*“ von C. Müller (43) abgeleitet.

Katheterintervention

Alle Katheterinterventionen wurden durch denselben interventionellen Radiologen der Abteilung für Radiologie der Charité Universitätsmedizin Berlin durchgeführt. Die A. femoralis communis wurde ultraschallgestützt punktiert. Eine Polyurethan-Schleuse mit 3 French Durchmesser (BALT, Montmorency, Frankreich) wurde in die A. femoralis communis platziert. Hierüber wurde ein nach individueller Anatomie ausgewählter 3 French C2-Katheter in die A. splenica geführt. Die Platzierung des Katheters wurde mittels digitaler Subtraktionsangiographie kontrolliert. Als Kontrastmittel wurde Iopromid mit einer Iod-Konzentration von 370 mg/ml verwendet (Ultravist 370; Bayer, Berlin, Deutschland). Falls während der Angiographie der Nachweis einer prominenten A. Gastroepiploica erfolgte, wurde diese mittels Microcoils vor der ersten Zellgabe verschlossen, um Zelltranslokation in die Magenwand zu vermeiden. Nach korrekter Platzierung des Katheters für die Intervention wurde dieser fixiert und bis zum Abschluss der Zellapplikation vor Ort belassen.

Zellvorbereitung und Handhabung bei HcTx

Die für die HcTx verwendeten Hepatozyten wurden von Cytonet GmbH & Co. KG, Weinheim, Deutschland, bereitgestellt. Die Zellen wurden als Suspension humaner heterologer Hepatozyten geliefert, die den Zellsuspensionen entspricht, welche in klinischen Studien zu Harnstoffzyklusdefekten an 0 - 5-Jährigen verwendet wurden (CCD02 in Deutschland, CCD05 in USA/Kanada).

Die Zellen der Suspension wurden mittels zweistufiger Kollagenase-Perfusion des Lebergewebes gewonnen. Aufgrund bestehenden Urheberrechts durch Cytonet GmbH & Co. KG können keine genaueren Informationen hierzu bereitgestellt werden. Die Leberspender wurden negativ auf HIV, Hepatitis B und Hepatitis C getestet. Weitere übertragbare Krankheiten sowie mikrobielles Wachstum wurden ebenfalls ausgeschlossen. Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff kryokonserviert transportiert. Die Temperatur der Zellen wurde nach Erhalt und vor Verwendung kontrolliert. Die Zellsuspensionen wurden in einem Wasserbad bei 40 °C aufgetaut. Im Anschluss erfolgte eine Zellzählung sowie eine Überprüfung der Viabilität mittels Trypanblau-Exklusions-Test. Zielbereich der Viabilität

nach Auftauen war 50 % - 65 %. Bei einer Viabilität unter 45 % erfolgt keine Transplantation der Zellen. Keine Charge fiel unter das gesetzte Limit.

Zellapplikation

Pro Intervention erfolgten zwei Zellinfusionen. Die Obergrenze der Zellzahl pro Infusion wurde auf 1×10^8 Zellen pro kg Körpergewicht festgesetzt. Ziel war eine Infusion von $3,3 \times 10^7$ bis 5×10^7 an viablen Hepatozyten. Die Infusionsgeschwindigkeit betrug 0,5 bis 1,0 ml/min. Der Abstand der Infusionen pro Intervention lag bei ursprünglich 8 Stunden, wurde jedoch nach der ersten Intervention (Schwein 1, Finalisierung nach 2 Tagen) auf 2 Stunden reduziert, um die Narkosedauer zu verkürzen. Bei einem Versuchstier wurden zwei Interventionen im Abstand von 4 Tagen durchgeführt (Schwein 4).

Immunsuppression und medikamentöse Therapie

Die Induktion der Immunsuppression erfolgte vor Zellapplikation mit 10 mg/kg KG Methylprednisolon i.v. (Urbason; Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt, Deutschland). Im Anschluss erfolgte eine Immunsuppression mittels 10 mg Prednisolon p.o. einmal täglich (Decortin; Merck Serono GmbH, Darmstadt, Deutschland). Zusätzlich erfolgte eine Gabe von 0,1 mg/kg KG Tacrolimus p.o. zweimal täglich (Prograf; Astellas Pharma GmbH, München, Deutschland), ab dem Tag vor der ersten Zellapplikation. Der Tacrolimus-Spiegel wurde durch Blutentnahmen an den Tagen 0, 4, 6, 11 und 18 bestimmt. Im Verlauf wurden Dosisanpassungen vorgenommen, um eine Zielkonzentration im Serum von 10 - 15 µg/l zu erreichen. Eine kalkulierte antibiotische und antivirale Therapie wurde verabreicht, um das Risiko einer Infektion zu minimieren. Zusätzlich wurden 2,5 mg/kg KG Tulathromycin s.c. (Draxxin; Zoetis Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland) an Tag 0 und Tag 6 als Mykoplasmen-Prophylaxe verabreicht.

Anästhesie

Katheterinterventionen und CT-Bildgebung erfolgten unter Vollnarkose. Die Tiere wurden mit einer intramuskulären Injektion von 3 mg/kg Azaperon (Stresnil; Janssen Cilag, Neuss, Deutschland), 25 mg/kg Ketamin (Ursotamine; Serumwerk, Bernberg, Deutschland), 3,5 mg/kg Xylazinhydrochlorid (Rompun; Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) und 0,03 mg/kg Atropinsulfat (Atropin sulfat; B Braun, Melsungen, Deutschland) prämediziert. Die Tiere wurden oral intubiert (ID 4,0 mit Cuff, Mallinckrodt Medical, Athlone, Irland). Die Beatmung der Tiere erfolgte mit einem klinischen Beatmungsgerät

(Draeger Zeus Infinity Empowered, Lübeck, Deutschland). Die Tiere wurden durch eine kontinuierliche Applikation von 4 - 6 mg/kg Propofol (Fresenius Kabi Ag, Bad Homburg, Deutschland) und 15 - 25 mg/kg Ketamin (Actavis Group PTC EHF, München, Deutschland) unter Narkose gehalten.

Finalisierung, Gewinnung der Gewebeproben und Pathologie

Alle Tiere wurden in tiefer Narkose finalisiert. Die Organentnahme erfolgte nach Herzstillstand. Die Proben wurden im unmittelbaren Anschluss an die makroskopische Begutachtung entnommen. Gewebeproben der Leber, Milz und Lunge wurden nach einem standardisierten, systematischen Verfahren entnommen. Hierbei wurden multiple Proben jedes Leberlappens, jedes Lungenlappens und jeder Region der Milz entnommen. Im Falle makroskopischer Auffälligkeiten wurden auch zusätzliche Gewebeproben anderer Organe entnommen.

Immunhistologie der Versuchstiere

Alle entnommenen Gewebeproben wurden in Paraffin fixiert. Im Anschluss wurden humane Hepatozyten mittels human-spezifischem Ab7797 Anti-CK18-Antikörper (Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich) oder leberspezifischen OCH1E5-Antikörpern (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) gefärbt.

Die Färbung erfolgte nach der Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase (APAAP)-Methode mittels Dako Fuchsin-chromogen (Agligent Technologies). Zur Gegenfärbung wurde Hämatoxylin nach Mayer verwendet (AppliChem, Darmstadt, Deutschland). Die Anzahl der Hepatozyten pro Schnitt wurde in Stufen von 0 bis 3 skaliert.

Quantifizierung von Anti-Spender-Spezifischen Antikörpern

Die Entwicklung von Anti-Spender IgM und IgG-Antikörpern wurde am Institut für medizinische Immunologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Hierfür wurden Spenderhepatozyten mit dem Schweineserum inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-konjugierten Ziegen Anti-Schweine-IgM H/L oder Anti-Schweine-IgG H/L (Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich, AbD Serotec GmbH, Puchheim, Deutschland). Die Messung erfolgte mittels BD LSRFortessa (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Die Daten wurden mittels FlowJo-Software Version 10.1 (FlowJo, LLC, Ashland, OR, USA) analysiert. Die Menge

der produzierten Antikörper wird durch die Verschiebung des geometrischen Mittels zwischen Serumproben und Negativkontrollen dargestellt.

Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Die nicht-parametrischen Mann-Whitney oder Kruskal-Wallis-Tests wurden verwendet, um kategorische Parameter mit zwei oder mehr Gruppen auszuwerten. Der parametrische ungepaarte t-Test oder der one-way ANOVA wurden bei Gauscher Normalverteilung verwendet. Für die Korrelationsanalyse wurden Pearson- oder Spearman-Korrelations-Test verwendet. Ein p-Wert von $\leq 0,05$ wurde als signifikant angenommen. Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben. Die Gefäßdurchmesser wurden hinsichtlich Mittelwert, Median, Standardabweichung und Variationskoeffizient analysiert.

2.3 Ergebnisse

Durchschnittliches Ergebnis der Hepatozytenisolierungen

Insgesamt wurden die Ergebnisse von 190 Hepatozytenisolierungen analysiert. Das mittlere Spenderalter war 60 ± 1 Jahre. Hepatozytenisolierungen mittels zweistufiger Kollagenase-Perfusion resultierte in einer mittleren Ausbeute von $5,65 \pm 0,46 \times 10^6$ Zellen/g und einer durchschnittlichen Viabilität von $77,82 \% \pm 0,7 \%$. Die initiale Zellausbeute vor Percoll-Aufreinigung war $9,50 \pm 0,61 \times 10^6$ Zellen/g und die initiale Viabilität war $3,92 \% \pm 0,88 \%$. Das mittlere Percoll-Überleben, definiert als Quotient der Ausbeute an viablen Zellen vor und nach Percoll, war $53,25 \% \pm 1,49 \%$.

Analyse der isolierungs-spezifischen Parameter in der gesamten Kohorte

Als vorrangige Einflussfaktoren auf die Hepatozytenisolierung wurden kalte Ischämiezeit (CIT), Gewicht des Lebergewebes und Verdauzeit identifiziert: Kalte Ischämiezeit (durchschnittlich $23 \pm 1,2$ min) und das Gewicht des perfundierten Lebergewebes (durchschnittlich $32,2 \pm 1,3$ g) waren signifikant negativ mit der viablen Zellausbeute vor (CIT: $r=-0,16$, $p=0,044$; Gewicht: $r=-0,442$, $p<0,001$) und nach Percoll-Aufreinigung (CIT: $r=-0,196$, $p=0,016$, Gewicht: $r=-0,494$, $p<0,001$) korreliert. Das Gewicht des Lebergewebes war ebenfalls signifikant negativ korreliert mit der Viabilität nach Percoll ($r=-0,294$, $p<0,001$). Die Verdauzeit (durchschnittlich $11,6 \pm 0,4$ min) hatte eine signifikante negative Korrelation mit der Viabilität vor ($r=-0,294$, $p<0,001$) und nach Percoll ($r=-0,213$, $p=0,005$).

Vergleich der Eigenschaften der PVE und der non-PVE Gruppen

Aufgrund des festgestellten Einflusses der Kollagenase-Verdauzeit auf die Viabilität wurden sämtliche Isolierungen mit einer Verdauzeit von ≥ 20 min oder ohne Angabe der Verdauzeit von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Insgesamt wurden 27 Isolierungen an mit PVE vorbehandelten Proben und 122 Isolierungen von Proben ohne PVE analysiert. Zwischen diesen Kohorten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich Alter, Geschlecht, kalter Ischämiezeit, AST, Bilirubin, Quick, OP-Indikation, Gewicht des Lebergewebes, Ausmaß der Steatose oder Fibrose und Kollagenase-Verdauzeit.

Vergleich der Ergebnisse der Hepatozyten-Isolierung in PVE und non-PVE-Gruppe

Die durchschnittliche initiale viable Zellzahl in der Subgruppenanalyse betrug $10,16 \pm 2,03 \times 10^6$ Zellen/g in der PVE-Gruppe, und $9,70 \pm 0,73 \times 10^6$ Zellen/g in der non-PVE-Gruppe ($p=0,499$, Abb. 1). In der Ausbeute viabler Zellen nach Percoll-Aufreinigung

zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied ($p=0,819$). Die Viabilität der humanen Hepatozyten war in der PVE-Gruppe geringfügig höher, jedoch nicht in statistisch signifikantem Ausmaß ($p=0,209$ vor Percoll, $p=0,141$ nach Percoll). Das Percoll-Überleben zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede ($p=0,442$).

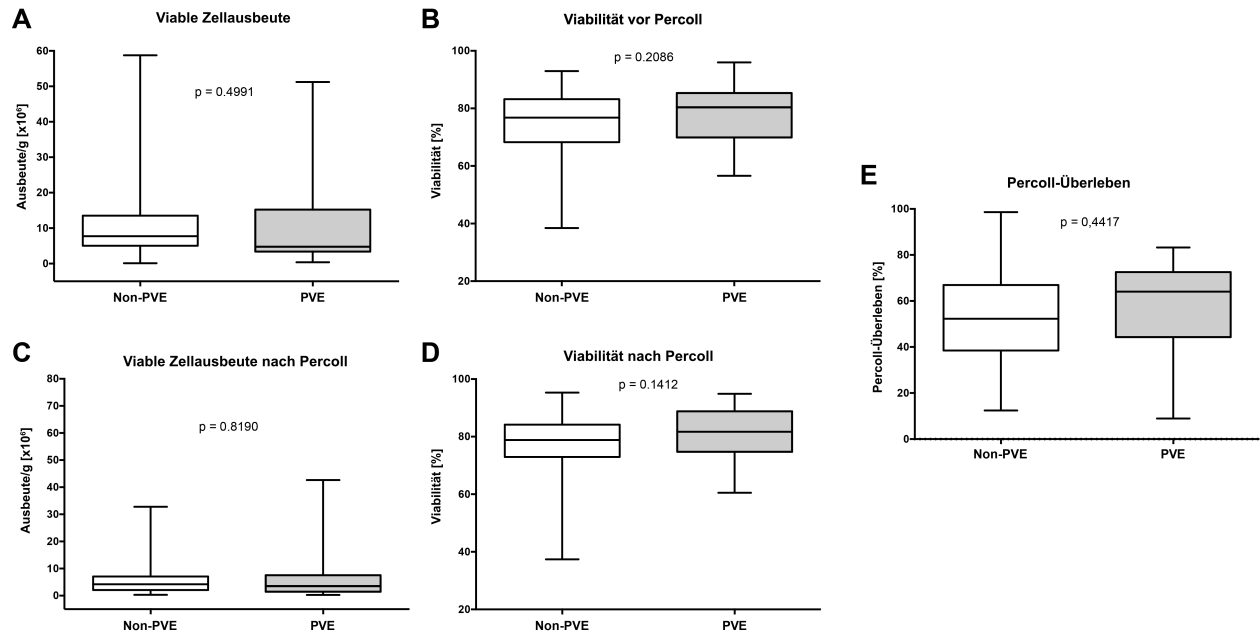


Abbildung 1: (A-E) Vergleich der Hepatozytenisolierungen von PVE und non-PVE Lebergewebe. Non-PVE-Gruppe $n=122$ Isolierungen; PVE-Gruppe: $n=27$ Isolierungen. *Boxplots* zeigen die 25. bis 75. Perzentile. Whiskers zeigen die jeweils höchsten und niedrigsten Werte. p -Werte wurden mittels Mann-Whitney U -Test oder ungepaartem t -Test bestimmt. Zuvor veröffentlicht in: *Human Hepatocyte isolation: Does Portal Vein Embolization Affect the Outcome? Tissue Engineering Part C: Methods.* Kluge et Al., 2016 (44) mit freundlicher Genehmigung von Mary Ann Liebert, Inc

Enzymfreisetzung und metabolische Funktion der isolierten Hepatozyten in Kultur

Hepatozyten aus PVE-Lebern zeigten einen Trend zur geringeren AST und ALT Freisetzung, im Vergleich zur non-PVE-Gruppe, jedoch ohne statistische Signifikanz (Tabelle 1). Urea und Albumin-Konzentrationen waren an keinem Tag der Kultur zwischen beiden Gruppen signifikant unterschiedlich. VEGF war in Hepatozyten aus PVE-Lebern an Tag 2 der Kultur geringfügig höher und an Tag 4 geringfügig niedriger.

Kategorie	Tag 2			Tag 4			Tag 6		
	Mean±SEM			Mean±SEM			Mean±SEM		
AST (U/l)	35,4±8,9	Non-PVE	p	35,6±7,1	Non-PVE	p	42,0±6,3	Non-PVE	p
ALT (U/l)	23,2±8,8	56,8±11,6	0,4	32,0±16,6	23,5±10,9	0,571	40,1±10,3	35,0±6,9	0,4
Urea (mg/ml)	6,5±1,1	43,6±11,4	0,229	6,2±1,8	52,3±29,2	0,629	6,4±1,3	51,9±21,4	>0,999
Albumin (ng/ml)	52,9±10,3	5,7±0,8	0,743	113,5±34,2	4,5±0,7	0,743	142,5±57,3	5,8±1,2	>0,999
VEGF (pg/ml)	283,7±54,5	204±90,7	0,743	278±40,4	349,3±107,6	0,857		106±48,8	0,571

Tabelle 1: Transaminasenfreesetzung und metabolische Aktivität der Hepatozyten aus PVE ($n=4$) und non-PVE ($n=3$)-Lebern. Daten sind als Mittelwerte ± Standardfehler (Mean ± SEM) und p -Werte angegeben. PVE: Portalvenöse Embolisierung; VEGF: Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor. P -Werte $<0,05$ wurden als signifikant angenommen.

Transfemoraler Zugang zur A. splenica

Die angiographische Katheterisierung der A. splenica war in allen Versuchstieren erfolgreich. Der Zugang zur A. femoralis war transdermal oder per offen chirurgischer Exploration möglich. Dopplersonographisch zeigte sich unmittelbar nach Zellapplikation kein Anhalt für Stenose oder Perfusionsminderung der A. splenica oder der Pfortader.

Durchmesser der vermessenen Gefäße

Die vollständigen Ergebnisse der Gefäßvermessung sind im Folgenden in Tabelle 2 dargestellt.

	Minimum	Maximum	Mittelwert	SD	CV %
Bulbus aorticus	8,9	12,0	10,7	1,4	12,75%
Aortenbogen	8,6	12,1	10,6	1,8	17,24%
Aorta thoracica (Trachealbifurkation)	7,4	8,4	8,1	0,5	5,84%
Aorta thoracica (5. Rippe)	6,6	8,1	7,2	0,7	10,07%
Aorta abdominalis (hiatus aorticus)	5,6	7,1	6,6	0,7	10,17%
Aorta abdominalis (Truncus coeliacus)	5,7	7,0	6,4	0,6	10,13%
Aorta abdominalis (Aa. renales)	5,2	6,3	5,8	0,5	8,87%
Aorta abdominalis (Bifurkation)	4,6	5,4	5,0	0,4	6,97%
A. iliaca externa dextra	2,9	4,0	3,7	0,5	14,24%
A. iliaca interna dextra	1,6	2,9	2,2	0,6	24,99%
A. iliaca externa sinistra	2,9	3,9	3,5	0,4	12,52%
A. iliaca interna sinistra	1,5	2,5	2,3	0,5	22,22%
Truncus coeliacus	3,2	4,1	3,7	0,4	10,27%
A. hepatica communis	2,4	2,8	2,6	0,2	7,02%
A. gastrica dextra *	1,5	2,3	1,8	0,4	24,22%
A. hepatica propria *	2,0	2,4	2,2	0,2	9,32%
A. splenica (Truncus)	2,3	3,2	2,7	0,4	14,44%
A. splenica (hilum)	2,0	2,5	2,3	0,2	9,06%
A. gastroepiploica *	1,2	1,6	1,4	0,2	14,52%
A. mesenterica superior	4,3	5,0	4,7	0,4	7,55%
A. mesenterica inferior *	1,0	1,6	1,3	0,3	23,08%
A. renalis dextra (aorta)	3,1	3,3	3,3	0,1	3,08%
A. renalis dextra (hilus)	2,8	3,0	2,9	0,1	3,98%
A. renalis sinistra (aorta)	3,1	3,8	3,5	0,3	9,04%
A. renalis sinistra (hilus)	2,8	3,2	3,0	0,2	6,82%
A. femoralis dextra	2,2	2,8	2,5	0,3	10,91%
A. femoralis sinistra	2,4	3,2	2,8	0,3	12,06%
A. carotis communis dextra	3,2	4,1	3,8	0,4	11,17%
A. carotis externa dextra	2,4	3,2	2,8	0,4	13,92%
A. carotis interna dextra *	1,8	2,6	2,3	0,4	18,37%
A. carotis communis sinistra	3,2	3,9	3,5	0,3	8,41%
A. carotis externa sinistra	2,1	3,8	3,0	0,7	23,28%
A. carotis interna sinistra	2,1	2,6	2,3	0,2	9,54%
A. subclavia dextra *	3,3	4,4	3,9	0,6	14,46%
A. subclavia sinistra *	3,8	4,4	4,2	0,3	8,25%

Tabelle 2: Ergebnisse der Gefäßvermessungen. Manche Gefäße sind an mehreren Punkten vermessen worden, die jeweiligen Messpunkte stehen innerhalb der Klammern. Mit Stern markierte Gefäße enthalten nur Daten aus drei Versuchstieren. Die Daten sind in mm angegeben. SD: Standardabweichung. CV: Variationskoeffizient.

Ergebnisse der immunhistologischen Auswertung

Sowohl am Tag der Intervention als auch an Tag zwei nach Intervention konnten Hepatozyten immunhistologisch in den Milzgefäßen nachgewiesen werden. In geringerer Zahl konnten Zellen im Milzparenchym dargestellt werden. Die immunhistologischen Färbungen der Leber am Tag der Intervention sowie zwei Tage nach Intervention konnten die

Translokation von humanen Hepatozyten von der Milz in die Leber nachweisen. Es zeigten sich ebenfalls größere Ansammlungen von Zellen in den hepatischen Gefäßen. In geringer Zahl konnten humane Hepatozyten auch im Leberparenchym nachgewiesen werden (Abb. 2). Im untersuchten Leber- und Milzparenchym fand sich kein Anhalt für Nekrose oder Ischämie. Die Architektur der Milz war größtenteils unverändert. Eine geringe Anzahl von Zellen konnte von der Leber in die Lunge translozieren. Hier konnten die humanen Hepatozyten bis zu 14 Tage nach der letzten Zellinfusion nachgewiesen werden. Die semi-quantitative Auswertung der Zellzahl zeigt Hepatozyten in einem beachtlichen Anteil der untersuchten Gewebeprobe (Abb. 3).

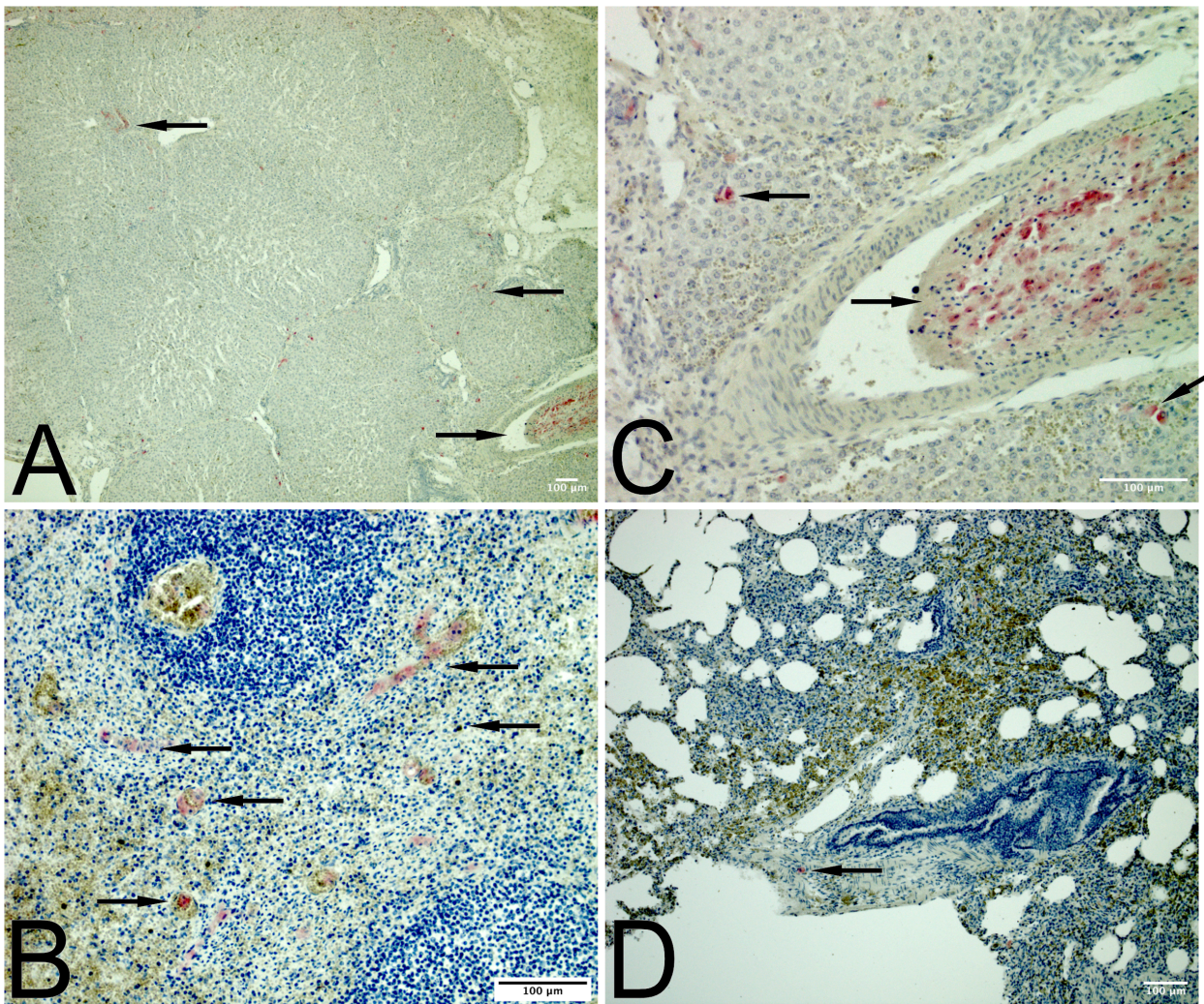


Abbildung 2: Immunhistologie an Tagen 0 und 2 nach Infusion. A: Leber, Tag 0, humane Hepatozyten im Parenchym (←) und intravasale humane Hepatozyten im portalvenösen System (→). B: Leber, Tag 0, humane Hepatozyten im Parenchym (←) und intravasale humane Hepatozyten (→). C: Milz, Tag 2, humane Hepatozyten im Parenchym (←) und intravasale humane Hepatozyten (→). D: Lunge, Tag 0, humane Hepatozyten im Parenchym (←) Zuvor veröffentlicht in: „*Hepatocyte Transplantation to the Liver via the Splenic Artery in a Juvenile Large Animal Model*“, *Cell Transplantation*, Siefert et Al. 2019 (46) via „Green Open Access“-Richtlinie der Sage Publishing Inc.

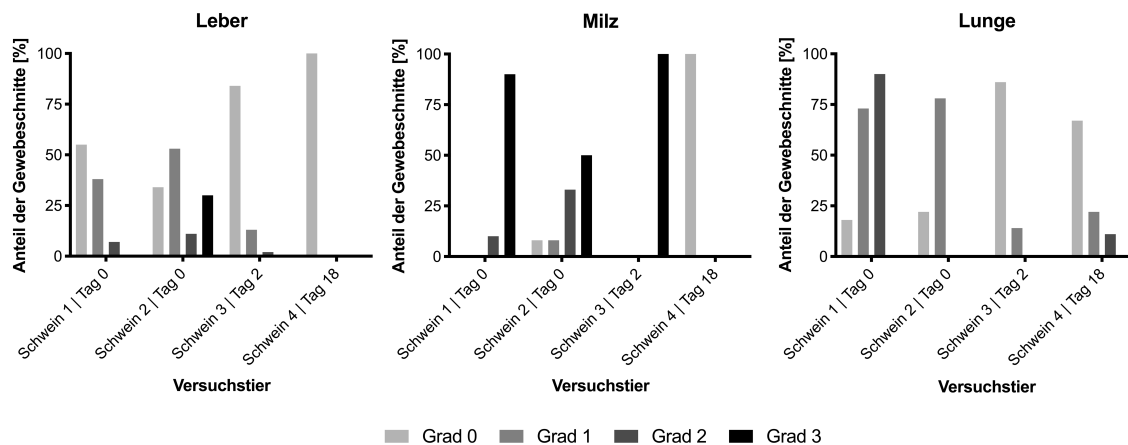


Abbildung 3: Semi-Quantitative Auswertung der Immunhistologie. Aufteilung nach Versuchstier und Organ. Detektion der humanen Hepatozyten, in Prozenten der untersuchten histologischen Schnitte. Einteilung in Grade entsprechend folgender Definition: **Grad 0:** Keine humanen Hepatozyten detektiert. **Grad 1:** Humane Hepatozyten detektiert, entweder wenige disseminierte Zellen oder ein kleines Konglomerat. **Grad 2:** Humane Hepatozyten detektiert, entweder viele disseminierte Zellen oder ein großes Konglomerat. **Grad 3:** Humane Hepatozyten detektiert, entweder ein großes Konglomerat und viele disseminierte Zellen oder viele große Konglomerate. Zuvor veröffentlicht in: „Hepatoocyte Transplantation to the Liver via the Splenic Artery in a Juvenile Large Animal Model“, *Cell Transplantation*, Siefert et Al. 2019 (46) via „Green Open Access“-Richtlinie der Sage Publishing Inc.

Immunhistologisch konnten zwei Wochen nach der letzten Zellinfusion keine transplantierten humanen Hepatozyten in Leber und Milz nachgewiesen werden. Jedoch konnten residuale humane Hepatozyten in der Lunge dargestellt werden (Abb. 4).

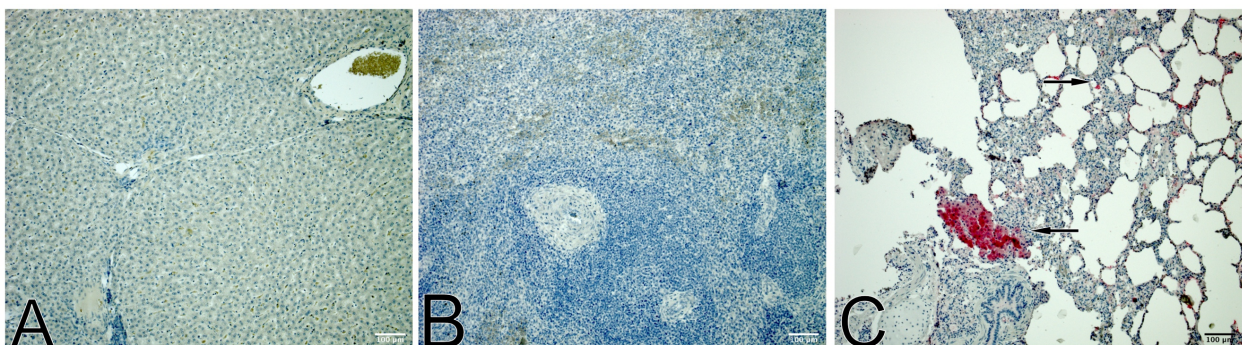


Abbildung 4: Immunhistologie an Tag 18 nach der ersten Infusion. 14 Tage nach der letzten Infusion lassen sich Hepatozyten weder in Leber noch Milz darstellen. A: Leber, keine humanen Hepatozyten sichtbar. B: Milz, keine humanen Hepatozyten sichtbar. C: Lunge, OCH1E5-Färbung. Intraparenchymale Hepatozyten (←) und intravasale Hepatozyten (→). Zuvor veröffentlicht in: „Hepatoocyte Transplantation to the Liver via the Splenic Artery in a Juvenile Large Animal Model“, *Cell Transplantation*, Siefert et Al. 2019 (46) via „Green Open Access“-Richtlinie der Sage Publishing Inc.

Interventions-assoziierte Komplikationen

In zwei Versuchstieren sind katheterassoziierte Komplikationen aufgetreten: In beiden Fällen trat eine hämodynamisch relevante Blutung nach Entfernung der Schleuse auf. In der Folge wurde die A. femoralis in weiteren Versuchen ligiert, was gut toleriert wurde. In einem Tier führte die Blutung zu einem Abfall des Hämoglobin-Spiegels von 99 g/l auf 37 g/l, diese normalisierten sich jedoch nach Ablauf einer Woche wieder. Das zweite der Versuchstiere musste aufgrund einer nicht stillbaren Blutung finalisiert werden. Zudem

traten in zwei weiteren Tieren Narkosezwischenfälle auf, welche ebenfalls in der Finalisierung der Versuchstiere mündeten. Bei einem Tier wurde *post mortem* eine Nekrose der Magenwand festgestellt. Diese wurde auf Translokation von humanen Hepatozyten über die *A. gastroepiploica* in die *A. gastrica sinistra* zurückgeführt. In den folgenden Versuchen wurde diese Komplikation durch das Coiling der *A. gastroepiploica* verhindert. Es wurden keine Nebenwirkungen durch das Coiling beobachtet.

Generierung spenderspezifischer Antikörper

Um herauszufinden, weswegen 14 Tage nach der letzten Infusion keine Zellen mehr nachzuweisen waren, wurde untersucht, ob eine Reaktion des adaptiven Immunsystems stattgefunden hat. Konsekutiv gesammelte Serumproben wurden daher auf das Vorliegen von spezifischen Anti-IgM- und Anti-IgG-Antikörpern gegen die transplantierten humanen Hepatozyten untersucht. Die Infusion von Hepatozyten zweier verschiedener Spender (Charge #1 und #2) hat im zeitlichen Verlauf die Produktion von IgM- und IgG-Antikörpern angeregt (Abb. 5).

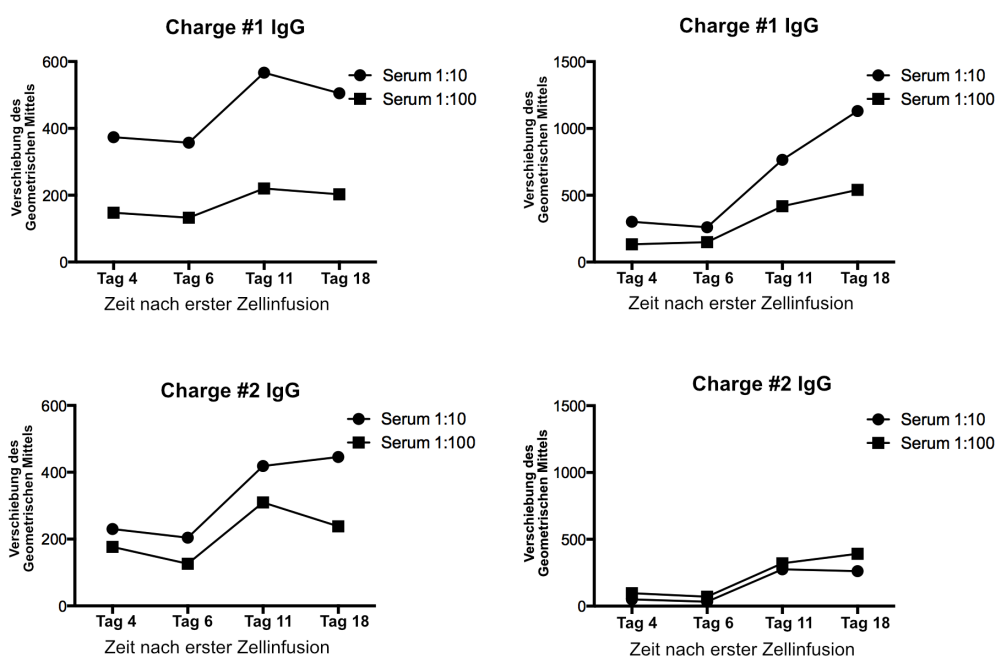


Abbildung 5: Antikörperproduktion. Infusion der Hepatozyten induziert Zell-spezifische IgM und IgG Produktion (Charge #1 und #2). Zuvor veröffentlicht in: „*Hepatocyte Transplantation to the Liver via the Splenic Artery in a Juvenile Large Animal Model*“, *Cell Transplantation*, Siefert et Al. 2019 (46) via „Green Open Access“-Richtlinie der Sage Publishing Inc.

2.4 Diskussion

Die Verfügbarkeit von humanen Hepatozyten ist von großer Wichtigkeit für die Weiterentwicklung der HcTx. Da die PVE zu einer gängigen Prozedur vor erweiterten Leberteilresektionen geworden ist (49), welche die am häufigsten genutzte Zellquelle für Leberzellisolierungen für Forschungszwecke darstellen, werden vermehrt Hepatozyten aus Lebergewebe von PVE-Patienten isoliert. Hierbei ist die zentrale Frage, ob dieses Lebergewebe eine geeignete Quelle von Hepatozyten darstellt, oder ob durch die PVE hervorgerufene Änderungen in Lebermetabolismus oder -Architektur die Isolierung negativ beeinflussen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die PVE keinen negativen Effekt auf das Outcome der Leberzellisolierung hat: Die Zellausbeute und -Viabilität des Lebergewebes nach PVE war im Vergleich zur nicht-embolisierten Kontrollgruppe nicht verringert.

Harida et al. haben ausgehend von histologischen Untersuchungen geschlossen, dass periportale Zellen sensitiv gegenüber Veränderungen, wie die durch die PVE hervorgerufene relative Hypoxie, sein müssten (50). In diesem Sinne könnte relative Hypoxie durch die portalvenöse Embolisation einen besseren Schutz vor hypoxischem Stress während der Zellisolierung bedeuten, wie beispielsweise in der ischämischen Präkonditionierung (51). Jedoch war VEGF, welcher durch hypoxische Bedingungen induziert wird (52), in der Hepatozytenkultur in PVE-Lebern nicht signifikant erhöht.

Die durchgeführten Analysen von Transaminasenfreesetzung und metabolischer Aktivität der kultivierten Hepatozyten zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen Hepatozyten aus PVE-Lebern im Vergleich zu Hepatozyten aus nicht-embolisierten Lebern. Dies stützt die Annahme, dass Hepatozyten aus PVE-Lebern gegenüber Hepatozyten aus nicht-embolisierten Lebern nicht unterlegen sind und sich daher für die HcTx eignen. Jedoch sind noch weitere Studien mit größeren Fallzahlen notwendig, um diese Annahme zu untermauern.

Großtiermodelle sind wichtig für die Etablierung neuer chirurgischer und interventioneller Verfahren. Enosawa et al. haben bereits die Tauglichkeit des juvenilen Schweins als Modell für die Leberzelltransplantation demonstriert (53). Die HcTx mittels transfemorale Katheterisierung der A. splenica wurde bisher jedoch noch nicht im juvenilen Großtiermodell evaluiert. Zur Evaluation dieser Fragestellung sind zuverlässige Gefäßdaten des juvenilen Göttingen Minipig notwendig. In der durchgeführten Studie konnten die

Durchmesser relevanter Ziel- und Zugangsgefäße im juvenilen Göttingen Minipig bestimmt werden.

Ein in der klinischen Praxis wichtiges Zugangsgefäß für transarterielle Katheterisierungen ist die A. femoralis. Der mittlere gemessene Durchmesser der A. femoralis betrug linksseitig 2,5 mm und rechtsseitig 2,8 mm. Dies ermöglicht prinzipiell die Verwendung von 21-Gauge Zugangsnadeln. Zudem sind Ballonangioplastien prinzipiell bereits über 4 F Katheterschleusen möglich (54). Mit zukünftigen Fortschritten in der Mikrokathetertechnologie sollte das juvenile Göttingen Minipig ein geeignetes Versuchstiermodell für transfemorale Katheterisierung sein.

Falls größere Zugangsgefäße notwendig sein sollten, kommen insbesondere die Aa. subclaviae in Frage, der rechtsseitige Durchmesser beträgt hier 3,9 mm, der linksseitige 4,2 mm.

Der mit Kontrastmittel-CT erhobene Datensatz der arteriellen Gefäße liefert zuverlässige und genaue Ergebnisse. Jedoch ist in kleineren Strukturen die Zuverlässigkeit der Messungen durch die Auflösung limitiert. Zudem variieren die arteriellen Durchmesser zwischen den Versuchstieren. Die größten Variationen zwischen den Versuchstieren wurden in A. iliaca interna, A. mesenterica inferior und der rechten A. carotis externa gemessen. Dies ist vermutlich auf die geringen Durchmesser dieser Gefäße zurückzuführen. Die gängigen Zugangs- und Zielgefäße haben geringere Variationskoeffizienten.

Die Anzahl der vermessenen Tiere ist mit vier jedoch limitiert. Zudem wären weitere Daten zu Tieren unterschiedlichen Gewichts und Geschlechts notwendig, um einen vollständigeren Datensatz zu generieren.

Jedoch sollten die erhobenen Daten ein realistisches Bild der Gefäßanatomie des acht Wochen alten Göttingen Minipig liefern, welches somit ein geeignetes präklinisches Versuchstiermodell für den menschlichen Neugeborenen darstellt. Durch die vorausschauende Prüfung der gemessenen Durchmesser der jeweiligen Zugangs- und Zielgefäße können Versuche besser geplant werden. Probleme aufgrund der Durchmesser der verwendeten Materialien oder Erreichbarkeit der Zielstruktur ließen sich gegebenenfalls vorhersehen und umgehen. Vorversuche zur Etablierung eines interventionellen Zugangs, wie sie im zugrundeliegenden Tierversuchsverfahren notwendig waren, ließen sich gegebenenfalls vermeiden. Die erhobenen Daten könnten somit dazu beitragen, die Anzahl und die Belastung der Versuchstiere zu reduzieren. Wir hoffen damit einen wertvollen Beitrag zu „reduction“ und „refinement“ im Sinne der 3R-Prinzipien der Tierversuchsforschung (replacement, reduction and refinement) (55) zu liefern.

Nach entsprechender Planung anhand der CT-morphologischen Daten war die interventionelle Katheterisierung der A. splenica über die A. femoralis in allen Versuchstieren erfolgreich. Hierdurch konnte die Durchführbarkeit der Zellapplikation in die A. splenica demonstriert werden. Im Verlauf ist keine relevante thromboembolische Komplikation aufgetreten.

In dieser Studie konnte die Translokation von Zellen in das portalvenöse System und das Leberparenchym nachgewiesen werden. Dies verifiziert die Ergebnisse von Strom et al., welche als erste eine mögliche Zelltranslokation von Hepatozyten in die Leber nach Zellapplikation in die A. splenica im Menschen beschrieben hatten. Jedoch hatten Strom et al. Zweifel an diesem Ergebnis, da dieses möglicherweise methodenbedingt durch mittransfundierte Spenderleukozyten hervorgerufen worden sein konnte (26).

Da Hepatozyten natürlicherweise in der Leber beheimatet sind und Gallensekretion der transplantierten Hepatozyten durch eine Verbindung mit dem biliären System prinzipiell möglich ist, scheint eine Translokation der Hepatozyten in die Leber für das Langzeitüberleben der Zellen von Vorteil zu sein.

Zudem gelang der Nachweis von humanen Hepatozyten in der Lunge. Bilir et al. hatten die Zelltranslokation in die Lungen bei intraportaler Infusion von Hepatozyten bereits nachgewiesen (56). Unser Experiment zeigt, dass Transfusion über die A. splenica Zelltranslokation in die Lungen nicht verhindert. Die Zahl der translozierenden Zellen kann durch die systematische histologische Untersuchung jedoch nur geschätzt werden.

In der durchgeführten Studie konnte jedoch trotz immunsuppressiver Therapie kein zufriedenstellendes Langzeitüberleben der Zellen gesichert werden. Obgleich bis zu 70 % der Zellen vom angeborenen Immunsystem abgebaut werden (57), scheint eine T-Zellvermittelte Reaktion des adaptiven Immunsystems der limitierende Faktor für das Langzeitüberleben zu sein (58). Dies deckt sich mit den Ergebnissen der immunologischen Analysen, welche eine Reaktion des adaptiven Immunsystems zeigen.

Es gibt in der Forschung aktuell verschiedene Ansätze zur Verringerung der Zellabstoßung. Aktuelle Felder hierbei sind Präkonditionierung des Empfängerorgans mittels ionisierender Strahlung (59), Gentherapie (60, 61) und Mikroenkapsulation (62, 63). Mit Fortschritten bei der Immunmodulation sollte sich das Ergebnis von HcTx verbessern. Falls diese Fortschritte zu einer gesteigerten Nachfrage nach HcTx führen, könnte die untersuchte Applikationsroute aufgrund klinisch breiterer Verfügbarkeit von Vorteil sein.

Jedoch war das Studiendesign anfällig für Komplikationen: Da die Zellapplikation unter Antikoagulation durchgeführt werden musste, waren die Tiere anfällig für Blutungskomplikationen. Während dies bei zwei der Versuchstiere kein Problem darstellte, erlitten zwei der Tiere hämodynamisch relevante Blutungen aus der Punktionsstelle. Zudem stellte sich die notwendige lange Narkose der Versuchstiere schwierig dar, weshalb zwei der Versuchstiere nach Narkosezwischenfällen finalisiert werden mussten. Diese Komplikationen hängen jedoch stark mit dem Versuchstiermodell zusammen: Eine langfristige postinterventionelle Kompression der arteriellen Gefäße ist nach Abschluss der Narkose im Versuchstier nicht möglich. Zudem ist es aufgrund der hohen Mobilität der Versuchstiere notwendig, diese über den gesamten Applikationszeitraum in tiefer Narkose zu belassen. In menschlichen Säuglingen wäre eine Fortführung der Anästhesie nach Sicherung des Katheters voraussichtlich nicht notwendig. Zudem sollte ein Verweilen der Schleuse über den gesamten Applikationszyklus möglich sein, wodurch eine wiederholte Punktion der Femoralgefäße nicht notwendig sein sollte. Dies würde das Risiko für Blutungskomplikationen minimieren. Somit wären bereits die beiden wichtigsten Fallstricke des Experiments eliminiert.

Die Studie war als Pilotstudie der Machbarkeit und Sicherheit der Zelltransplantation über die A. splenica im Säugling konzipiert. Die Anzahl der verwendeten Versuchstiere war limitiert (n=4). Aufgrund der beobachteten Komplikationen kann nicht sicher gesagt werden, dass der transfemorale Zugang zur A. splenica gegenüber dem transhepatischen- oder intraportalen Zugang gleichwertig oder überlegen ist. Da jedoch letale portalvenöse Thrombosen nach portalvenösem Zugang für HcTx beschrieben wurden (24), ist die Evaluation alternativer Applikationsrouten für die Sicherheit zukünftiger Studien zur HcTx relevant.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass das juvenile Göttingen Minipig ein für Katheterinterventionen geeignetes Gefäßsystem besitzt und somit ein geeignetes Versuchstiermodell für den menschlichen Säugling darstellt. In diesem Versuchstiermodell ist Leberzelltransplantation über transfemorale Katheterisierung der A. splenica möglich. Zudem konnte bewiesen werden, dass Hepatozyten nach Infusion in die A. splenica in die Leber translozieren. Es konnte jedoch kein Langzeitüberleben der Zellen erreicht werden. Zudem traten gehäuft Blutungs- und Narkosekomplikationen auf. Jedoch sind viele der beobachteten Probleme auf das Versuchstiermodell zurückzuführen. Mit zukünftigen

Fortschritten in der Verhinderung von Zellabstoßung sollten weitere Studien zur Evaluation der Zellapplikation in die A. splenica folgen.

Zukünftige Studien hierzu benötigen eine weitreichende Verfügbarkeit von humanen Hepatozyten. Hierfür konnte gezeigt werden, dass die Hepatozytenisolierung aus Lebergewebe welches portalvenös embolisiert wurde, nicht-embolisertem Lebergewebe hinsichtlich Zellausbeute und Viabilität nicht unterlegen ist. Mit PVE vorbehandelte Lebern stellen dementsprechend eine geeignete Quelle an humanen Hepatozyten dar.

Literaturverzeichnis

1. Fitzpatrick E, Mitry RR, Dhawan A. Human hepatocyte transplantation: state of the art. *J Intern Med.* 2009;266(4):339-57.
2. Mitry RR, Dhawan A, Hughes RD, Bansal S, Lehec S, Terry C, Heaton ND, Karani JB, Mieli-Vergani G, Rela M. One liver, three recipients: segment IV from split-liver procedures as a source of hepatocytes for cell transplantation. *Transplantation.* 2004;77(10):1614-6.
3. Meyburg J, Schmidt J, Hoffmann GF. Liver cell transplantation in children. *Clin Transplant.* 2009;23 Suppl 21:75-82.
4. Struecker B, Raschzok N, Sauer IM. Liver support strategies: cutting-edge technologies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2014;11(3):166-76.
5. Alexandre E, Cahn M, Abadie-Viollon C, Meyer N, Heyd B, Manton G, Cinqualbre J, David P, Jaeck D, Richert L. Influence of pre-, intra- and post-operative parameters of donor liver on the outcome of isolated human hepatocytes. *Cell Tissue Bank.* 2002;3(4):223-33.
6. Richert L, Alexandre E, Lloyd T, Orr S, Viollon-Abadie C, Patel R, Kingston S, Berry D, Dennison A, Heyd B, Manton G, Jaeck D. Tissue collection, transport and isolation procedures required to optimize human hepatocyte isolation from waste liver surgical resections. A multilaboratory study. *Liver Int.* 2004;24(4):371-8.
7. Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration. *Hepatology.* 2006;43(2 Suppl 1):S45-53.
8. Malinowski M, Geisel D, Stary V, Denecke T, Seehofer D, Jara M, Baron A, Pratschke J, Gebauer B, Stockmann M. Portal vein embolization with plug/coils improves hepatectomy outcome. *J Surg Res.* 2015;194(1):202-11.
9. de Baere T, Roche A, Elias D, Lasser P, Lagrange C, Bousson V. Preoperative portal vein embolization for extension of hepatectomy indications. *Hepatology.* 1996;24(6):1386-91.
10. Hemming AW, Reed AI, Howard RJ, Fujita S, Hochwald SN, Caridi JG, Hawkins IF, Vauthey JN. Preoperative portal vein embolization for extended hepatectomy. *Ann Surg.* 2003;237(5):686-91; discussion 91-3.
11. Vondran FW, Katenz E, Schwartlander R, Morgul MH, Raschzok N, Gong X, Cheng X, Kehr D, Sauer IM. Isolation of primary human hepatocytes after partial hepatectomy: criteria for identification of the most promising liver specimen. *Artif Organs.* 2008;32(3):205-13.
12. Lee SM, Schelcher C, Laubender RP, Froese N, Thasler RM, Schiergens TS, Mansmann U, Thasler WE. An algorithm that predicts the viability and the yield of human hepatocytes isolated from remnant liver pieces obtained from liver resections. *PLoS One.* 2014;9(10):e107567.
13. Lloyd TD, Orr S, Patel R, Crees G, Chavda S, Vadyar H, Berry DP, Sherlock D, Dennison AR. Effect of patient, operative and isolation factors on subsequent yield and viability of human hepatocytes for research use. *Cell Tissue Bank.* 2004;5(2):81-7.
14. Kawahara T, Toso C, Douglas DN, Nourbakhsh M, Lewis JT, Tyrrell DL, Lund GA, Churchill TA, Kneteman NM. Factors affecting hepatocyte isolation, engraftment, and replication in an in vivo model. *Liver Transpl.* 2010;16(8):974-82.
15. Mitry RR, Hughes RD, Aw MM, Terry C, Mieli-Vergani G, Girlanda R, Muiesan P, Rela M, Heaton ND, Dhawan A. Human hepatocyte isolation and relationship of cell viability to early graft function. *Cell Transplant.* 2003;12(1):69-74.
16. Alexandrova K, Griesel C, Barthold M, Heuft HG, Ott M, Winkler M, Schrem H, Manns MP, Bredehorn T, Net M, Vidal MM, Kafert-Kasting S, Arseniev L. Large-scale

- isolation of human hepatocytes for therapeutic application. *Cell Transplant*. 2005;14(10):845-53.
17. Hughes RD, Mitry RR, Dhawan A, Lehec SC, Girlanda R, Rela M, Heaton ND, Muiesan P. Isolation of hepatocytes from livers from non-heart-beating donors for cell transplantation. *Liver Transpl*. 2006;12(5):713-7.
 18. Dhawan A, Puppi J, Hughes RD, Mitry RR. Human hepatocyte transplantation: current experience and future challenges. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010;7(5):288-98.
 19. Lysy PA, Najimi M, Stephenne X, Bourgois A, Smets F, Sokal EM. Liver cell transplantation for Crigler-Najjar syndrome type I: update and perspectives. *World J Gastroenterol*. 2008;14(22):3464-70.
 20. Stephenne X, Najimi M, Sibille C, Nassogne MC, Smets F, Sokal EM. Sustained engraftment and tissue enzyme activity after liver cell transplantation for argininosuccinate lyase deficiency. *Gastroenterology*. 2006;130(4):1317-23.
 21. Dhawan A, Mitry RR, Hughes RD, Lehec S, Terry C, Bansal S, Arya R, Wade JJ, Verma A, Heaton ND, Rela M, Mieli-Vergani G. Hepatocyte transplantation for inherited factor VII deficiency. *Transplantation*. 2004;78(12):1812-4.
 22. Coley BD, Hogan MJ. Image-guided interventions in neonates. *Eur J Radiol*. 2006;60(2):208-20.
 23. Gramignoli R, Vosough M, Kannisto K, Srinivasan RC, Strom SC. Clinical hepatocyte transplantation: practical limits and possible solutions. *Eur Surg Res*. 2015;54(3-4):162-77.
 24. Baccarani U, Adani GL, Sanna A, Avellini C, Sainz-Barriga M, Lorenzin D, Montanaro D, Gasparini D, Risaliti A, Donini A, Bresadola F. Portal vein thrombosis after intraportal hepatocytes transplantation in a liver transplant recipient. *Transpl Int*. 2005;18(6):750-4.
 25. Quaglia A, Lehec SC, Hughes RD, Mitry RR, Knisely AS, Devereaux S, Richards J, Rela M, Heaton ND, Portmann BC, Dhawan A. Liver after hepatocyte transplantation for liver-based metabolic disorders in children. *Cell Transplant*. 2008;17(12):1403-14.
 26. Strom SC, Fisher RA, Thompson MT, Sanyal AJ, Cole PE, Ham JM, Posner MP. Hepatocyte transplantation as a bridge to orthotopic liver transplantation in terminal liver failure. *Transplantation*. 1997;63(4):559-69.
 27. Wang F, Zhou L, Ma X, Ma W, Wang C, Lu Y, Chen Y, An L, An W, Yang Y. Monitoring of intrasplenic hepatocyte transplantation for acute-on-chronic liver failure: a prospective five-year follow-up study. *Transplant Proc*. 2014;46(1):192-8.
 28. Pareja E, Gomez-Lechon MJ, Cortes M, Bonora-Centelles A, Castell JV, Mir J. Human hepatocyte transplantation in patients with hepatic failure awaiting a graft. *Eur Surg Res*. 2013;50(3-4):273-81.
 29. Jorns C, Ellis EC, Nowak G, Fischler B, Nemeth A, Strom SC, Ericzon BG. Hepatocyte transplantation for inherited metabolic diseases of the liver. *J Intern Med*. 2012;272(3):201-23.
 30. Mito M, Kusano M, Kawaura Y. Hepatocyte transplantation in man. *Transplant Proc*. 1992;24(6):3052-3.
 31. Gupta S, Lee CD, Vemuru RP, Bhargava KK. ¹¹¹Indium labeling of hepatocytes for analysis of short-term biodistribution of transplanted cells. *Hepatology*. 1994;19(3):750-7.
 32. Raschzok N, Teichgraber U, Billecke N, Zielinski A, Steinz K, Kammer NN, Morgul MH, Schmeisser S, Adonopoulou MK, Morawietz L, Hiebl B, Schwartlander R, Rudinger W, Hamm B, Neuhaus P, Sauer IM. Monitoring of Liver Cell Transplantation in

- a Preclinical Swine Model Using Magnetic Resonance Imaging. *Cell Med.* 2010;1(3):123-35.
33. Hansel MC, Gramignoli R, Skvorak KJ, Dorko K, Marongiu F, Blake W, Davila J, Strom SC. The history and use of human hepatocytes for the treatment of liver diseases: the first 100 patients. *Curr Protoc Toxicol.* 2014;62:14 2 1-23.
 34. Aria D, Vatsky S, Towbin R, Schaefer CM, Kaye R. Interventional radiology in the neonate and young infant. *Semin Ultrasound CT MR.* 2014;35(6):588-607.
 35. Kohn F, Sharifi AR, Simianer H. Modeling the growth of the Goettingen minipig. *J Anim Sci.* 2007;85(1):84-92.
 36. Georgiev S, Schoen, A. Das Verhalten des Göttinger Miniturschweines bei unterschiedlichen Luftfeuchtigkeitsgraden und Wärmebelastung. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 1973;86:208-13.
 37. Stubhan M, Markert M, Mayer K, Trautmann T, Klumpp A, Henke J, Guth B. Evaluation of cardiovascular and ECG parameters in the normal, freely moving Gottingen Minipig. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2008;57(3):202-11.
 38. Seidenkranz HG, Holtz W, Smidt D, Perings E. [Effect of azathioprine on reproductive functions in the Gottingen miniature swine]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 1975;82(6):238-44.
 39. Grote W, Schulz LC, Drommer W, Überschar S, Schafer EA. [Test of combination of the agents coumarin and troxerutin for embryotoxic and teratogenic side-effects in Gottingen miniature pigs (author's transl)]. *Arzneimittelforschung.* 1977;27(3):613-7.
 40. Wachtel W. Untersuchungen über Herzminutenvolumen, arteriovenöse Sauerstoffdifferenz, Hämoglobingehalt und Erythrozytenzahlen bei Haus- und Wildschweinen. *Arch Exp Veterinarmed.* 1963(17):787-98.
 41. Kolb E. *Lehrbuch der Physiologie der Haustiere.* Stuttgart: Gustav Fischer Verlag; 1989.
 42. Hannon JP, Bossone CA, Wade CE. Normal physiological values for conscious pigs used in biomedical research. *Lab Anim Sci.* 1990;40(3):293-8.
 43. Müller C. Computertomographisch gestützte Makro- und Mikromorphometrie von Blutgefäßen des Göttingen Minipigs® [Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin]. Berlin: Freie Universität Berlin; 2011.
 44. Kluge M, Reutzel-Selke A, Napierala H, Hillebrandt KH, Major RD, Struecker B, Leder A, Siefert J, Tang P, Lippert S, Sallmon H, Seehofer D, Pratschke J, Sauer IM, Raschzok N. Human Hepatocyte Isolation: Does Portal Vein Embolization Affect the Outcome? *Tissue Eng Part C Methods.* 2016;22(1):38-48.
 45. Siefert J, Hillebrandt KH, Kluge M, Geisel D, Podrabsky P, Denecke T, Nosser M, Gassner J, Reutzel-Selke A, Strucker B, Morgul MH, Guel-Klein S, Unger JK, Reske A, Pratschke J, Sauer IM, Raschzok N. Computed tomography-based survey of the vascular anatomy of the juvenile Gottingen minipig. *Lab Anim.* 2016.
 46. Siefert J, Hillebrandt KH, Moosburner S, Podrabsky P, Geisel D, Denecke T, Unger JK, Sawitzki B, Gul-Klein S, Lippert S, Tang P, Reutzel-Selke A, Morgul MH, Reske AW, Kafert-Kasting S, Rudinger W, Oetvoes J, Pratschke J, Sauer IM, Raschzok N. Hepatocyte Transplantation to the Liver via the Splenic Artery in a Juvenile Large Animal Model. *Cell Transplant.* 2019:963689719885091.
 47. Dorko K, Freeswick PD, Bartoli F, Cicalese L, Bardsley BA, Tzakis A, Nussler AK. A new technique for isolating and culturing human hepatocytes from whole or split livers not used for transplantation. *Cell Transplant.* 1994;3(5):387-95.

48. Katenz E, Vondran FW, Schwartlander R, Pless G, Gong X, Cheng X, Neuhaus P, Sauer IM. Cryopreservation of primary human hepatocytes: the benefit of trehalose as an additional cryoprotective agent. *Liver Transpl.* 2007;13(1):38-45.
49. Malinowski M, Stary V, Lock JF, Schulz A, Jara M, Seehofer D, Gebauer B, Denecke T, Geisel D, Neuhaus P, Stockmann M. Factors influencing hypertrophy of the left lateral liver lobe after portal vein embolization. *Langenbecks Arch Surg.* 2015;400(2):237-46.
50. Harada H, Imamura H, Miyagawa S, Kawasaki S. Fate of the human liver after hemihepatic portal vein embolization: cell kinetic and morphometric study. *Hepatology.* 1997;26(5):1162-70.
51. Selzner N, Rudiger H, Graf R, Clavien PA. Protective strategies against ischemic injury of the liver. *Gastroenterology.* 2003;125(3):917-36.
52. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature.* 1992;359(6398):843-5.
53. Enosawa S, Yuan W, Douzen M, Nakazawa A, Omasa T, Fukuda A, Sakamoto S, Shigeta T, Kasahara M. Consideration of a Safe Protocol for Hepatocyte Transplantation Using Infantile Pigs. *Cell Med.* 2012;3(1-3):13-8.
54. He L, Liu F, Wu L, Qi CH, Zhang LF, Huang GY. Percutaneous balloon angioplasty for severe native aortic coarctation in young infants less than 6 months: medium- to long-term follow-up. *Chin Med J (Engl).* 2015;128(8):1021-5.
55. Kirk RGW. Recovering The Principles of Humane Experimental Technique: The 3Rs and the Human Essence of Animal Research. *Sci Technol Human Values.* 2018;43(4):622-48.
56. Bilir BM, Guinette D, Karrer F, Kumpe DA, Krysl J, Stephens J, McGavran L, Ostrowska A, Durham J. Hepatocyte transplantation in acute liver failure. *Liver Transpl.* 2000;6(1):32-40.
57. Gupta S, Rajvanshi P, Sokhi R, Slehria S, Yam A, Kerr A, Novikoff PM. Entry and integration of transplanted hepatocytes in rat liver plates occur by disruption of hepatic sinusoidal endothelium. *Hepatology.* 1999;29(2):509-19.
58. Bumgardner GL, Heininger M, Li J, Xia D, Parker-Thornburg J, Ferguson RM, Orosz CG. A functional model of hepatocyte transplantation for in vivo immunologic studies. *Transplantation.* 1998;65(1):53-61.
59. Soltys KA, Setoyama K, Tafaleng EN, Soto Gutierrez A, Fong J, Fukumitsu K, Nishikawa T, Nagaya M, Sada R, Haberman K, Gramignoli R, Dorko K, Tahan V, Dreyzin A, Baskin K, Crowley JJ, Quader MA, Deutsch M, Ashokkumar C, Shneider BL, Squires RH, Ranganathan S, Reyes-Mugica M, Dobrowolski SF, Mazariegos G, Elango R, Stolz DB, Strom SC, Vockley G, Roy-Chowdhury J, Cascalho M, Guha C, Sindhi R, Platt JL, Fox IJ. Host conditioning and rejection monitoring in hepatocyte transplantation in humans. *J Hepatol.* 2017;66(5):987-1000.
60. Nicolas CT, Hickey RD, Allen KL, Du Z, Guthman RM, Kaiser RA, Amiot B, Bansal A, Pandey MK, Suksanpaisan L, DeGrado TR, Nyberg SL, Lillegard JB. Hepatocyte spheroids as an alternative to single cells for transplantation after ex vivo gene therapy in mice and pig models. *Surgery.* 2018;164(3):473-81.
61. Matsui A, Uchida S, Hayashi A, Kataoka K, Itaka K. Prolonged engraftment of transplanted hepatocytes in the liver by transient pro-survival factor supplementation using ex vivo mRNA transfection. *J Control Release.* 2018;285:1-11.
62. Machaidze Z, Yeh H, Wei L, Schuetz C, Carvello M, Sgroi A, Smith RN, Schuurman HJ, Sachs DH, Morel P, Markmann JF, Buhler LH. Testing of microencapsulated porcine hepatocytes in a new model of fulminant liver failure in baboons. *Xenotransplantation.* 2017;24(3).

63. Meier RPH, Navarro-Alvarez N, Morel P, Schuurman HJ, Strom S, Buhler LH. Current status of hepatocyte xenotransplantation. *Int J Surg.* 2015;23(Pt B):273-9.

3. Eidesstattliche Versicherung und Anteilserklärung

Eidesstattliche Versicherung

„Ich Jeffrey Clemens Siefert, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Weiterentwicklung der Leberzelltransplantation: „In vitro Untersuchungen zur Leberzellisolierung und Transplantation im Großtiermodell/Evolving hepatocyte transplantation: In vitro examinations to hepatocyte isolation and transplantation in a large animal model.“

selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Jeffrey Clemens Siefert hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: **Siefert J**, Hillebrandt KH, Moosburner S, Podrabsky P, Geisel D, Denecke T, Unger JK, Sawitzki B, Gül-Klein S, Lippert S, Tang P, Reutzel-Selke A, Morgul MH, Reske AW, Kafert-Kasting S, Rüdinger W, Oetvoes J, Pratschke J, Sauer IM, Raschzok N. Hepatocyte Transplantation to the Liver via the Splenic Artery in a Juvenile Large Animal Model., Cell Transplantation. 2019 Dec;28(1_suppl):14S-24S

Beitrag im Einzelnen:

1. Planung, Design und Durchführung der Studie
 - Organisation der Tierexperimente inklusive des Transportes und Überführung der zu transplantierenden Hepatozyten und Organisation und Auswahl der benötigten Versuchsmaterialien
 - Mitarbeit an den Interventionen am Versuchstier, inklusive selbständiger Durchführung von periinterventionellen Ultraschalluntersuchungen und Blutgasanalysen zum Monitoring möglicher Komplikationen, selbstständige Transplantation der Hepatozyten und erste Assistenz bei Implantation der Broviac-Katheter

- Postinterventionelle Pflege und Medikation der Versuchstiere, inklusive Überarbeitungen des Medikationsprotokolls
 - Erarbeitung problemorientierter Revisionen des Versuchsprotokolls
2. Literaturrecherche
- Literaturrecherche zur Auswahl und zur kritischen Bewertung möglicher geeigneter Methoden zur Auswertung, inklusive Auswahl und Verbesserung der immunhistologischen Färbungen (Fig. 3, Fig. 4 und Fig. 5) sowie kritischer Bewertung nicht in die Auswertung einfließender Methoden (s. Diskussion)
 - Literaturrecherche zur Manuskripterstellung
3. Datenerhebung
- Entnahme und Verarbeitung der Blutproben zur Generierung der klinischen Chemie sowie zur Bestimmung spenderspezifischer Antikörper (Fig. 7)
 - Sämtliche Schritte in der Herstellung histologischer Schritte inklusive Entnahme der Gewebeproben für die Herstellung sowie Entwässerung, Paraffin-Einbettung und Schneiden der Proben am Mikrotom, sowie Etablierung und Durchführung aller immunhistologischen Färbungen (s. Fig. 3 und Fig. 5)
 - Selbstständige Entwicklung des Bewertungsmaßstabs für die semiquantitative Auswertung der Immunhistologie, aus welchem Fig. 4 hervor geht
4. Datenauswertung
- Semi-Quantitative Auswertung aller immunhistologischen Schnitte mit konzeptionellem Entwurf der grafischen Darstellung (Fig. 4)
 - Durchführung der Korrelationsanalyse (s. Diskussion)
 - Beurteilung und Interpretation der klinischen Chemie (s. Ergebnisse, Diskussion)
5. Manuskripterstellung
- Selbstständige Erstellung des Manuskripts inklusive Literaturrecherche sowie Erstellung der Grafiken Fig. 2, Fig. 3 sowie Fig. 5 und Fig. 6. Evaluation der Korrekturen der Co-Autoren sowie Zusammenführung der Versionen
 - Einreichung des Manuskripts und selbstständige Bearbeitung der Revisionen im Publikationsprozess

Publikation 2: **Siefert J**, Hillebrandt KH, Kluge M, Geisel D, Podrabsky P, Denecke T, Nösser M, Gassner J, Reutzel-Selke A, Strücker B, Morgul MH, Guel-Klein S, Unger JK, Reske A, Pratschke J, Sauer IM, Raschok N. Computed Tomography-Based Survey of the Vascular Anatomy of the Juvenile Göttingen Minipig., Laboratory Animals. 2017 Aug;51(4):388-396.

Beitrag im Einzelnen:

1. Planung, Design und Durchführung der Studie
- Entwicklung des Studiendesigns, Mitarbeit bei der Entwicklung des Messprotokolls für die Gefäßdurchmesser (s. Fig. 1, Methoden)

- Erarbeitung der Messpunkte für die Gefäßdurchmesser (s. Tab. 1)
 - Mitarbeit bei der Durchführung der CT-Angiographien, inklusive manueller Beatmung der Versuchstiere im CT
2. Literaturrecherche
 - Literaturrecherche zur Definition geeigneter Messpunkte
 - Literaturrecherche zur Manuskripterstellung
 3. Datenerhebung
 - Etablierung und Prüfung des Messprotokolls in der Praxis
 - Durchführung einer der Messungen der Gefäßdurchmesser (s. Tab. 1)
 - Zusammenführung der Messungen aller Messenden, Identifikation von Datenfehlern und Ausreißern, sowie Moderation der Konsens-Entscheidungen (s. Methoden)
 4. Datenauswertung
 - Durchführung der deskriptiven Statistik der gemessenen Gefäßdurchmesser (s. Tab. 1, Fig. 3 und Fig. 4)
 - Tabellarische Darstellung der erhobenen Daten (Tab. 1)
 - Grafische Darstellung der Ergebnisse der statistischen Auswertungen (Fig. 3 und Fig. 4)
 5. Manuskripterstellung
 - Selbstständige Erstellung des Manuskripts inklusive Literaturrecherche, sowie Erstellung der Grafiken Fig.1, Fig. 3 und Fig. 4. Evaluation der Korrekturen der Co-Autoren, sowie Zusammenführung der Versionen
 - Einreichung des Manuskripts und selbstständige Bearbeitung der Revisionen im Publikationsprozess

Publikation 3: Kluge M, Reutzel-Selke A, Napierala H, Hillebrandt KH, Major RD, Struecker B, Leder A, **Siefert J**, Tang P, Lippert S, Sallmon H, Seehofer D, Pratschke J, Sauer IM, Raschzok N.

Human Hepatocyte Isolation: Does Portal Vein Embolization Affect the Outcome?, Tissue Engineering Part C: Methods. 2016 Jan;22(1):38-48.

Beitrag im Einzelnen:

1. Literaturrecherche
 - Recherche zur Identifikation von Faktoren welche die Hepatozytenisolierung beeinflussen (Tab. 1)
2. Datenerhebung:
 - Durchführung von Leberzellisolationen und der Hepatozytenkulturen im Studienzeitraum
 - Retrospektiven Generierung von Patientendaten anhand welcher die Analysen in Tab. 2, Tab. 3, Tab. 4 sowie Fig. 1 durchgeführt wurden
 - Retrospektive Auswertung von Analyseergebnissen vergangener Leberzelltransplantationen, deren Ergebnisse u.a. in Tab. 2, Tab. 3, Tab. 4 sowie Fig. 1 und Fig. 2 eingeflossen sind
 - Selbstständige Etablierung des Humanalbumin-Elisa am Standort sowie Anpassung des Protokolls für die spezifische Fragestellung, welcher in Tab. 5 eingeflossen ist.

- Mitarbeit bei der Durchführung der weiteren laborchemischen Verfahren von Tab. 5
3. Manuskripterstellung
- Kritische Revision des Manuskripts und der Grafiken vor der Einreichung zur Veröffentlichung

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

4. Druckexemplare der ausgewählten Publikationen

4.1 Hepatocyte Transplantation to the Liver via the Splenic Artery in a Juvenile Large Animal Model.

Siefert J, Hillebrandt KH, Moosburner S, Podrabsky P, Geisel D, Denecke T, Unger JK, Sawitzki B, Gul-Klein S, Lippert S, Tang P, Reutzel-Selke A, Morgul MH, Reske AW, Kafert-Kasting S, Rudinger W, Oetvoes J, Pratschke J, Sauer IM, Raschzok N.

Hepatocyte Transplantation to the Liver via the Splenic Artery in a Juvenile Large Animal Model. Cell Transplant. 2019:963689719885091.

<https://doi.org/10.1177/0963689719885091>

4.2 Computed tomography-based survey of the vascular anatomy of the juvenile Göttingen minipig.

Siefert J, Hillebrandt KH, Kluge M, Geisel D, Podrabsky P, Denecke T, Nosser M, Gassner J, Reutzel-Selke A, Strucker B, Morgul MH, Guel-Klein S, Unger JK, Reske A, Pratschke J, Sauer IM, Raschzok N. Computed tomography-based survey of the vascular anatomy of the juvenile Gottingen minipig. Lab Anim. 2016.

<https://doi.org/10.1177%2F0023677216680238>

4.3 Human Hepatocyte Isolation: Does Portal Vein Embolization Affect the Outcome?

Kluge M, Reutzel-Selke A, Napierala H, Hillebrandt KH, Major RD, Struecker B, Leder A, Siefert J, Tang P, Lippert S, Sallmon H, Seehofer D, Pratschke J, Sauer IM, Raschzok N. Human Hepatocyte Isolation: Does Portal Vein Embolization Affect the Outcome? *Tissue Eng Part C Methods*. 2016;22(1):38-48.

<https://doi.org/10.1089/ten.tec.2015.0190>

5. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

6. Publikationsliste

Journal-Veröffentlichungen:

- 1) *Hepatocyte Transplantation to the Liver via the Splenic Artery in a Juvenile Large Animal Model.*

Siefert J, Hillebrandt KH, Moosburner S, Podrabsky P, Geisel D, Denecke T, Unger JK, Sawitzki B, Gül-Klein S, Lippert S, Tang P, Reutzel-Selke A, Morgul MH, Reske AW, Kafert-Kasting S, Rüdinger W, Oetvoes J, Pratschke J, Sauer IM, Raschzok N.

Cell Transplant. 2019 Dec;28(1_suppl):14S-24S.

doi:10.1177/0963689719885091. Epub 2019 Dec 17.

PMID: 31842585

Impact Factor (2018): 3,477

- 2) *Computed tomography-based survey of the vascular anatomy of the juvenile Göttingen minipig.*

Siefert J, Hillebrandt KH, Kluge M, Geisel D, Podrabsky P, Denecke T, Nösser M, Gassner J, Reutzel-Selke A, Strücker B, Morgul MH, Guel-Klein S, Unger JK, Reske A, Pratschke J, Sauer IM, Raschzok N.

Lab Anim. 2017 Aug;51(4):388-396. doi: 10.1177/0023677216680238. Epub

2016 Dec 8. PMID: 27932686

Impact Factor (2018): 1,117

- 3) *Human Hepatocyte Isolation: Does Portal Vein Embolization Affect the Outcome?*

Kluge M, Reutzel-Selke A, Napierala H, Hillebrandt KH, Major RD, Struecker B, Leder A, Siefert J, Tang P, Lippert S, Sallmon H, Seehofer D, Pratschke J, Sauer IM, Raschzok N.

Tissue Eng Part C Methods. 2016 Jan;22(1):38-48. doi:

10.1089/ten.TEC.2015.0190. Epub 2015 Dec 1.

PMID: 26449914

Impact Factor (2018): 2,638

Kongressbeiträge:

- 1) Posterpräsentation auf dem 26. Internationalen Kongress der TTS (The transplant society), Hong Kong, 2016: *Coming home: Hepatocyte transplantation to*

the liver via the splenic artery in a juvenile large animal model. Raschzok N, **Siefert J**, Podrabsky P, Hillebrandt KH, Unger JK, Sawitzki B, Lippert S, Tang P, Reutzel-Selke A, Struecker B, Geisel D, Morgul H, Reske AW, Kafert-Kasting S, Rüdinger W, Rennecke J, Pickerodt PA, Gül-Klein S, Denecke T, Oetvoes J, Pratschke J, Sauer IM.

7. Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei PD Dr. Nathanael Raschzok für seine hervorragende Betreuung und Unterstützung bedanken, und auch dafür, allen Schwierigkeiten zum Trotz, am Tierversuchsprojekt festgehalten zu haben.

Weiterhin gilt ein besonderer Dank Prof. Dr. Igor M. Sauer, welcher nicht nur hervorragende Rahmenbedingungen für experimentelle Forschung geschaffen hat, sondern auch durch seine direkte Mitarbeit und Ideen wertvolle Beiträge geleistet hat.

Ebenfalls bedanke ich mich bei Dr. Anja Reutzel-Selke für die Unterstützung bei den statistischen Auswertungen und immunologischen Fragestellungen sowie für ihr stets offenes Ohr für die Doktoranden der Arbeitsgruppe.

Zudem danke ich Dr. Juliane Unger für ihre wertvolle fachliche Expertise im Umgang mit den Versuchstieren und für die gute Zusammenarbeit.

Des Weiteren danke ich den labortechnischen Assistenten Peter Tang und Steffen Lipfert für sämtliche Unterstützung im Labor sowie für den regen Austausch an Ideen bei analytischen Fragestellungen.

Großer Dank, für ihre Unterstützung und für die schöne gemeinsame Zeit, die hieraus erwachsen ist, gilt allen Doktorandinnen und Doktoranden der Arbeitsgruppe, die ich kennen lernen durfte, insbesondere Karl Hillebrandt, Martin Kluge, Rebeka Major, Rosa Horner, Joseph Gassner, Maximilian Nösser und Simon Moosburner.

Zudem danke ich Dr. Philipp Pickerodt für die Hilfe bei anästhesiologischen Fragestellungen, sowie PD Dr. med Dominik Geisel für die Beratung zu radiologischen Fragestellungen und die Schulung im Ultraschall.

Nicht minder danke ich zudem allen weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe und allen weiteren an den Projekten beteiligten Personen, deren explizite Nennung leider den Rahmen sprengen würde.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, meinen Eltern Dr. Jürgen Siefert und Catherine Noback sowie meinem Bruder Niklas Siefert, welche mich immer unterstützt haben und mich diese Unterstützung zu jeder Zeit spüren ließen, sowie meinen Freunden, welche mich auch in schwierigen Phasen aufgefangen haben und unterstützt haben.

Abschließend danke ich meiner Lebensgefährtin Viktoria Raufer, welche mich nicht nur mit nächtlichen Mahlzeiten im Labor versorgt hat, sondern mir auch den nötigen Halt und

die emotionale Unterstützung gegeben hat, die es möglich gemacht hat, diese Promotion zum Abschluss zu bringen.